

Verbindungen zur Modulation des Glykolyse-Enzym-
und/oder Transaminase-Komplexes.

5 Gebiet der Erfindung.

Die Erfindung betrifft Verbindungen zur Modulation des
Glykolyse-Enzym- und/oder Transaminase-Komplexes und
folglich insbesondere Wachstumshemmung von Zellen und/oder
10 Bakterien, pharmazeutische Zusammensetzungen enthaltend
solche Verbindungen sowie Verwendungen von solchen
Verbindungen zur Herstellung von pharmazeutischen
Zusammensetzungen zur Behandlung verschiedener
Krankheiten.

15

Hintergrund der Erfindung.

Krebs ist heutzutage eine der häufigsten Todesursachen und
20 die Zahl der Krebsfälle in den industrialisierten Ländern
nimmt ständig zu. Das beruht vor allem darauf, daß maligne
Tumoren eine Erkrankung des höheren Lebensalters sind und
dank der erfolgreichen Bekämpfung von Infektionskrank-
heiten jetzt mehr Menschen dieses Alter erreichen. Trotz
25 aller Fortschritte auf diagnostischem und therapeutischem
Gebiet liegen die Heilungsaussichten für die am häufigsten
auftretenden inneren Krebsformen selten über 20%. Eine
Krebsgeschwulst kann derzeit vernichtet oder in ihrem
Wachstum gehemmt werden. Eine Rückbildung einer Tumorzelle
30 in eine normale Zelle lässt sich noch nicht erreichen. Die
wichtigsten therapeutischen Maßnahmen, die Operation und
die Bestrahlung, entfernen Krebszellen aus dem Organismus.
Auch die derzeit gebräuchlichen Chemotherapeutika des

Krebses, die Zytostatika, führen nur zu einer Zerstörung oder Schädigung von Tumorzellen. Die Wirkung ist in den meisten Fällen so wenig spezifisch, daß gleichzeitig schwere Schäden an gesunden Zellen auftreten.

5

Im allgemeinen weisen Tumorzellen einen von gesunden Zellen abweichenden Metabolismus, insbesondere Glycolyse, auf. So ist eine Änderung des in die Glycolyse involvierten Isoenzym Systems und eine Änderung in dem
 10 Transport von NADH für Tumorzellen typisch. U.a. ist die Aktivität der Enzyme der Glycolyse erhöht. Dies erlaubt auch hohe Umsätze unter den bei Tumorzellen typischen aeroben Bedingungen. Im Detail wird hierzu auf E. Eigenbrodt et al., Biochemical an Molecular Aspects of
 15 Selected Cancers, Vol. 2, S. 311 ff., 1994, verwiesen.

Auch verschiedene andere, folgend genannte Krankheiten gehen entweder mit einer (übermäßigen) Verstoffwechselung über den Glykolyse-Enzymkomplex einher und lassen sich
 20 durch dessen Reduktion bzw. Hemmung behandeln.

Stand der Technik.

25 Aus der Literaturstelle E. Eigenbrodt et al., Biochemical an Molecular Aspects of Selected Cancers, Vol. 2, S. 311 ff., 1994, ist es bekannt, zur Hemmung der Glycolyse Glucoseanaloge einzusetzen. Andere hieraus bekannte Ansätze sind der Einsatz von Inhibitoren glycolytischer
 30 Isoenzyme, beispielsweise durch geeignete Komplexbildung oder Inhibierung von Komplexbildungen. Im Ergebnis werden Tumorzellen gleichsam ausgehungert. Problematisch bei den vorstehenden Verbindungen ist, daß viele davon

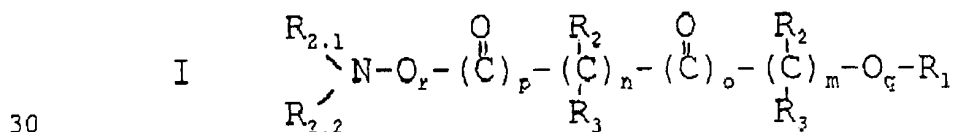
geneotoxisch sind und/oder nicht hinreichend spezifisch für Tumorzellen.

5 Technisches Problem der Erfindung.

Der vorliegenden Erfindung liegt das technische Problem zu Grunde, Wirkstoffe anzugeben, welche in der Lage sind, den Glykolyse-Enzym- und Transaminase-Komplex zu modulieren
 10 bzw. zu hemmen, insbesondere die Proliferation von Krebszellen und somit das Wachstum neoplastischer Tumore zu hemmen sowie überschießende Abwehrreaktionen des Körpers, wie z.B. septischer Schock, Autoimmunerkrankungen, Transplantatabstoßungen sowie akute und chronische
 15 Entzündungsreaktionen zu inhibieren, und zwar bei gleichzeitig lediglich geringfügiger bis keiner Zytotoxizität gegenüber Zellen mit intaktem Glykolyse-Enzym-Komplex oder anderen Komplex-Strukturen. Zusätzlich soll das Wachstum von unizellulären Organismen
 20 gehemmt werden.

Grundzüge der Erfindung.

25 Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung eine Verbindung gemäß Formel I



wobei R1 = -CN, -COO⁺, -COS⁺, -COOH, -COSH, -COOR1.1, -COSR1.1, wobei R1.1 = -H, C1-10 Alkyl, C1-10 Aralkyl bzw. Aryl, wobei R2 = -H, -OR1.1, -Hal (-F -Cl, -Br, -J), -NR2.1R2.2, -Am, -O-Am, -S-Am, wobei R3 = -H, -OR1.1, -Hal (-F -Cl, -Br, -J), -NR2.1R2.2, -Am, -O-Am, -S-Am, wobei R2.1 = -H, C1-10 Alkyl, C1-10 Aralkyl bzw. Aryl, wobei R2.2 = -H, C1-10 Alkyl, C1-10 Aralkyl bzw. Aryl, wobei R2.1 und R2.2 gleich oder verschieden sein können, wobei n und m gleich oder verschieden und 0 bis 10 sein können, wobei o und p gleich oder verschieden und 0 bis 3 sein können, wobei o > 0 ist, wenn n und m = 0 sind, wobei R2 und R3 für Cn und Cm gleich oder verschieden sein können, wobei R2 für jedes Cx=1...n gleich oder verschieden sein kann, wobei R3 für jedes Cy=1...m gleich oder verschieden sein kann, wobei -Am einen Aminosäurenrest darstellt, wobei q und r = 0 oder 1 sowie gleich oder verschieden sind, wobei -O_r- und/oder -O_q- auch durch -S_r- bzw. -S_q- ersetzt sein kann, wobei -NR2.1R2.2 ersetzt sein kann durch lineares oder verzweigtes -C1-C20 Alkyl, oder ein physiologisch verträgliches Salz einer solchen Verbindung.

Ein Aminosäurenrest ist in einer Aminosäure wie folgt definiert: NH₂-CHAm-COOH. In Frage kommen insbesondere Aminosäurenreste der proteinogenen Aminosäuren, speziell der essentiellen Aminosäuren. Soweit eine erfindungsgemäße Verbindung optische Aktivität aufweist (beispielsweise gemäß Ausführungsformen des Anspruches 3), sind die verschiedenen Varianten, wie L- und D-Form mit umfaßt. Entsprechendes gilt im Falle (mehrerer) chiraler Zentren.

30

Besonders geeignet sind erfindungsgemäße Verbindungen, wobei R2 zumindest einfach als -Am vorliegt, wobei -Am vorzugsweise einen Aminosäurenrest einer essentiellen

Aminosäure darstellt, wobei insbesondere $q = 0$ und $r = 1$ oder $q = 1$ und $r = 0$ oder $q = 1$ und $r = 1$, $m = 1$, $R_3 = -H$, $n = o = p = 0$, $R_{2.1} = R_{2.2} = -H$ ist.

- 5 Desweiteren sind verschiedene konkrete Gruppen bevorzugt, nämlich: i) wobei $n = o = p = 0$ ist, wobei $m = 0$ bis 4 ist, wobei $R_2 = R_3 = -H$ ist, wobei $R_{2.1} = R_{2.2} = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist, ii) wobei $m = p = 0$ ist, wobei $o = 1$ ist, wobei $n = 0$ bis 4 ist, wobei $R_2 = H$ ist, wobei
- 10 $R_3 = -H$ oder $-Hal$ im Falle von $C_x=1$ ist, wobei $R_3 = -H$ ist für alle $C_x=n>1$, wobei $R_{2.1} = R_{2.2} = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist, iii) wobei $m = 1$ bis 4 ist, wobei $n = o = p = 0$ ist, wobei $R_2 = H$ ist, wobei $R_3 = -H$ oder $-Hal$ im Falle von $C_y=1$ ist, wobei $R_3 = -H$ ist für alle $C_y=m>1$,
- 15 wobei $R_{2.1} = R_{2.2} = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist, iv), wobei $o = p = 1$ ist, wobei $m = 0$ ist, wobei $n = 0$ bis 4 ist, wobei $R_2 = R_3 = -H$ ist, wobei $R_{2.1} = R_{2.2} = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist, v), wobei $n = p = 0$ ist, wobei $o = 1$ ist, wobei $m = 0$ bis 4 ist, wobei $R_2 = R_3 = -H$ ist,
- 20 wobei $R_{2.1} = R_{2.2} = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist, oder vi) wobei $m = p = 0$ ist, wobei $o = 1$ ist, wobei $n = 1$ bis 4 ist, wobei $R_2 = R_3 = -H$ ist, wobei $R_{2.1} = R_{2.2} = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist.

25 Generell kann ein R_2 durch $-Am$ ersetzt sein.

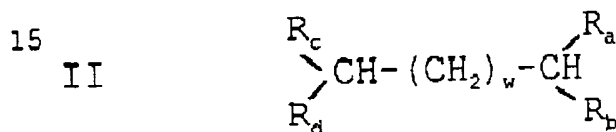
- Beispiele für Verbindungen, in denen $-NR_{2.1}R_{2.2}$ ersetzt ist durch $-C_1-C_{20}$ Alkyl sind: $CH_3-O-(CH_2)_n-R_1$,
 $CH_3-O-CO-(CH_2)_n-R_1$, $CR_5R_6R_7-O-(CH_2)_n-R_1$,
 30 $CR_5R_6R_7-O-CO-(CH_2)_n-R_1$, wobei R_5 , R_6 und R_7 $-C_1-C_{10}$ Alkyl, linear oder verzweigt, nicht substituiert oder substituiert, sein kann. $(CH_2)_n$ kann selbstverständlich auch (CR_2R_3) sein. $-O-$ bzw. $=O$ kann durch $-S-$ bzw. $=S$ ersetzt

sein. R1 ist wie vorstehend angegeben. CR5R6R7 kann insbesondere t-Butyl sein.

Beispiele für erfindungsgemäße Verbindungen sind:

- 5 $\text{NH}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_m\text{-R1}$, $\text{NH}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-R1}$, $\text{NH}_2\text{-O-CHHal-(CO)}_o\text{-R1}$,
 $\text{NH}_2\text{-O-CHHal-CH}_2\text{-(CO)}_o\text{-R1}$, $\text{NH}_2\text{-O-CHHal-(CH}_2\text{)}_2\text{-(CO)}_o\text{-R1}$,
 $\text{NH}_2\text{-O-CHHal-(CH}_2\text{)}_3\text{-(CO)}_o\text{-R1}$, $\text{NH}_2\text{-O-CHHal-(CH}_2\text{)}_4\text{-(CO)}_o\text{-R1}$,
 $\text{NH}_2\text{-O-CO-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-R1}$, $\text{NH}_2\text{-O-CO-(CH}_2\text{)}_n\text{-R1}$, $\text{NH}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-R1}$,
 $\text{NH}_2\text{-O-CO-(CH}_2\text{)}_n\text{-CHNH}_2\text{-R1}$, $\text{NH}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-CHNH}_2\text{-R1}$, mit R1 = -CN
 10 oder -COOH, m bzw. n = 0-4, o = 0 oder 1, wobei -O- durch
 S ersetzt sein kann.

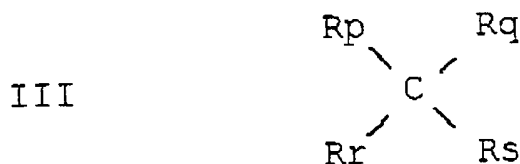
Eine andere erfindungsgemäße Formel ist Formel II



- wobei $\text{R}_a = \text{-CN}$, $\text{R}_b = \text{-H, =O, -OH, -NH}_2$, $\text{R}_c = \text{-NH}_2, \text{-O-NH}_2,$
 -O-(Cl-10)Alkyl , $\text{R}_d = \text{-H, -Hal, =O, -OH}$, wobei im Falle von
 20 =O das H eines CH entfällt, wobei w = 0-10, z.B. 1 bis 4.

Eine weitere erfindungsgemäße Formel ist Formel III

25



30

wobei $\text{Rp} = \text{-R1, -O-R1, -O-(CR}_2\text{R}_3\text{)}_x\text{-R1, -(CR}_2\text{R}_3\text{)}_x\text{-O-R1}$, $\text{Rq} =$
 $\text{-NR}_2.1\text{R}_2.2, \text{-O-NR}_2.1\text{R}_2.2, \text{-O-(CR}_2\text{R}_3\text{)}_x\text{-NR}_2.1\text{R}_2.2,$
 $\text{-(CR}_2\text{R}_3\text{)}_x\text{-O-NR}_2.1\text{R}_2.2$, $\text{Rr} = \text{-Am, -O-Am, -O-(CR}_2\text{R}_3\text{)}_x\text{-Am}$,

-(CR₂R₃)_x-O-Am, R_s = -H, -C₁-C₁₀ Alkyl, Aryl oder Araklyl,
 -C₁-C₁₀ Hydroxyalkyl, Aryl oder Aralkyl, oder ein Ether
 eines solchen Hydroxyrestes, wobei -O- ersetzt sein kann
 durch -S- und x = 1 bis 10, insbesondere 1 bis 4. R₁ ist
 5 wie vorstehend angegeben, insbesondere -CN oder -COOH.
 Beispiele solcher Verbindungen sind: NH₂-O-CHAm-R₁,
 NH₂-CHAm-O-R₁, NH₂-O-CHAm-O-R₁, NH₂-CHR₁-O-Am,
 Am-O-CHNH₂-O-R₁, NH₂-O-(Am-O-CH-O-R₁). Auf einer Seite
 eines -O- oder mehrerer -O- oder auf beiden Seiten eines
 10 -O- oder mehrerer -O- kann unmittelbar -(CH₂)_x- zwisch-
 eingeschaltet sein.

Erfindungsgemäße Substanzen können, pH-abhängig, in Lösung
 ionisiert vorliegen (z.B. als -COO⁻ im Basischen oder als
 15 -NH₃⁺ im Sauren). Es können auch Salze, wie Hydrochloride
 usw. gebildet sein.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß neben den
 klassischen Stoffwechselerkrankungen, wie Diabetes melli-
 20 tus, Adipositas auch andere Erkrankungen, wie Krebs, Auto-
 immunerkrankungen und Rheuma durch Stoffwechselent-
 gleisungen verursacht werden. Dies erklärt den starken
 Einfluss der Ernährung auf diese Erkrankungen. Ein direk-
 ter messbarer biochemischer Parameter für diese Stoffwech-
 25 selentgleisungen ist der Anstieg der Pyruvatkinase Typ M2
 (M2-PK), die im Blut von Patienten aller vorstehend und
 folgend genannter Erkrankungen ansteigt. In Abhängigkeit
 von der jeweiligen Erkrankung kommt die im Blut der Pa-
 tienten nachweisbare M2-PK aus unterschiedlichen Zellen:
 30 bei Krebs aus Tumorzellen, bei Sepsis aus Immunzellen, bei
 Rheuma aus Immun- und/oder Sinovialzellen. In gesunden
 Zellen findet sich die tetramere Form der M2-PK in einem
 hoch geordneten cytosolischen Komplex, dem Glykolyse-

Enzym-Komplex. Durch die Überaktivierung von Oncoproteinen kommt es zur Auswanderung der M2-PK aus dem Komplex und zu den typischen Veränderungen im Tumor-Stoffwechsel.

Gleichzeitig verlässt die Phosphoglyceromutase (PGM) den Komplex und wandert in einen anderen Enzym-Komplex, in dem cytosolische Transaminasen assoziiert sind (siehe Beispiel 2). Dieser Komplex wird daher als Transaminase-Komplex bezeichnet. Das Substrat der PGM, Glycerat-3-P, ist die Vorstufe für die Synthese der Aminosäuren Serin und Glycin. Beide Aminosäuren sind essentiell für die DNA- und Phospholipid-Synthese. Durch das Einwandern der PGM in den Transaminase-Komplex wird die Synthese von Serin aus Glutamat und damit die Glutaminolyse aktiviert. Die gleichen Veränderungen finden in Immunzellen statt, wenn das Immunsystem entgleist, wie beispielsweise bei Rheuma, Sepsis oder Polytrauma. Die Integration des Stoffwechsels von verschiedenen Zellen in multizellulären Organismen erfolgt durch Organ-spezifische Assoziation der Enzyme im Cytosol: im Muskel z.B. durch Assoziation mit Kontraktionsproteinen. Aus diesem Grund sind die verschiedenen Organe mit jeweils spezifischen Isoenzymen ausgestattet. Die Auflösung dieser Ordnung führt zwangsläufig zu Erkrankungen. Unizelluläre Organismen, wie Bakterien oder Hefen, die auf ausreichendes Nahrungsangebot mit ungezügelter Proliferation reagieren, besitzen keine komplexe Organisation des Cytosols. Folglich hemmen Substanzen, die den entgleisten Stoffwechsel von multizellulären Organismen hemmen, auch die Proliferation von solchen unizellulären Organismen.

Die Erfindung lehrt weiterhin die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer oder mehrerer Erkrankungen aus der Gruppe bestehend aus "Krebs,

chronische Entzündungen, Asthma, Arthritis, Osteoarthritis, chronische Polyarthritis, rheumatische Arthritis, Inflammatory bowel disease, degenerative Gelenkerkrankungen, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises mit

5 Knorpelabbau, Sepsis, Autoimmunerkrankungen, Typ I Diabetes, Hashimoto-Thyreoiditis, Autoimmunthrombozytopenie, Multiple Sklerose, Myasthenia gravis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Morbus Crohn, Uveitis, Psoriasis, Kollagenosen, Goodpasture-Syndrom, Erkrankungen mit

10 gestörter Leukozyten-Adhäsion, Cachexie, Erkrankungen durch erhöhte TNFalpha Konzentration, Diabetes, Adipositas, bakterielle Infektionen, insbesondere mit resistenten Bakterien". Der Begriff der Behandlung umfaßt auch die Prophylaxe.

15

Die Erfindung lehrt des weiteren eine pharmazeutische Zusammensetzung, wobei eine erfindungsgemäße Verbindung mit einem oder mehreren physiologisch verträglichen

Hilfstoffen und/oder Trägerstoffen gemischt und galenisch

20 zur lokalen oder systemischen Gabe, insbesondere oral, parenteral, zur Infusion bzw. Infundierung in ein Zielorgan, zur Injektion (z.B. i.v., i.m., intrakapsulär oder intralumbal), zur Applikation in Zahntaschen (Raum zwischen Zahnwurzel und Zahnfleisch) hergerichtet ist.

25

Die Erfindung lehrt schließlich die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung zur in vitro Hemmung des Glykolyse-Enzymkomplexes, insbesondere von Pyruvatkinase, Asparaginase, Serindehydratasen, Transaminasen, De-

30 saminasen, und/oder Glutaminasen. Blockiert werden insbesondere die Transaminierung, die oxidative Desaminierung, die hydrolytische Desaminierung, die eliminierende

Desaminierung und die reduktive Desaminierung.

Es versteht sich, daß ggf. für Verbindungen nach Formel I verschiedenen Stereoisomere existieren können, 5 welche alle Gegenstand der Erfindung sind. Der Begriff Alkyl umfaßt lineare und verzweigte Alkygruppen sowie Cycloalkyl, ggf. auch Cycloalkylgruppen mit linearen oder verzweigten Alkylsubstituenten. Der Begriff Aryl umfaßt auch Aralkylgruppen, wobei Alkylsubstituenten 10 Alkyl oder Cycloalkyl sein können.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß erfindungsgemäße Verbindungen in der Lage sind, die vorstehend genannten Mitglieder der Glykolyse-Enzymkomplexes kom- 15 petitiv zu hemmen. So kann die Proliferation von Krebszellen in therapeutisch relevanten Konzentrationen gehemmt werden. Dabei ist in dem in Frage kommenden Dosisbereich keine zytotoxische Wirkung zu erwarten. Aufgrund ihrer pharmakologischen 20 Eigenschaften eignen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen auch hervorragend zur Behandlung und Prophylaxe der weiteren, vorstehend aufgezählten Erkrankungen. Im Zusammenhang mit den Indikationen zur Entzündungshemmung bzw. antirheumatische Wirkung ist 25 von besonderer Relevanz, daß es sich bei den erfindungsgemäßen Substanzen um nicht-steroidale Substanzen handelt.

Die Hemmung des Glykolyse-Enzym- und des Transaminase- 30 Komplexes umfaßt insbesondere die Hemmung der Verstoffwechselung und des Energiegewinns aus Serin, Glutamin, Ornithin, Prolin und Arginin oder aus anderen Aminosäuren dieser oder anderer Familien, aber

auch die Synthese solcher zur Energieerzeugung genutzten Aminosäuren; wichtigen Energiequellen beispielsweise in Tumorzellen, aber auch in Bakterien und Hefen. Die Zellen bzw. Bakterien oder Hefen werden

5 gleichsam ausgehungert. Im Einzelnen blockieren erfindungsgemäße Substanzen beispielsweise die folgenden Reaktionen: i) Threonin zu Glycin, ii) Threonin zu α -Amino- β -ketobutyrat, iii) α -Amino- β -ketobutyrat zu Glycin, iv) Serin-Pyridoxalphosphat (PLP) Schiff'sche

10 Base zu Aminoacrylat, insbesondere die Folsäure-abhängige Serinhydroxymethyltransferase, v) Aminoacrylat zu Pyruvat (durch Verschiebung des Gleichgewichts der natürlichen Hydrolyse der PLP Schiff'schen Base hin zur Schiff'schen Base), vi) Transaminierung mit-

15 tels PLP zur Synthese einer Aminosäure aus einer Oxosäure, insbesondere der verzweigtkettigen Transaminase, die α -Ketoglutarat, Oxalacetat, 3-Hydroxypyruvat und Glyoxalat Transaminase, die Glutamat Dehydrogenase. Insbesondere wird mit erfindungs-

20 gemäßen Substanzen die Bildung von Pyruvat aus Aminosäuren gehemmt. Wichtig ist die Freisetzung von $\text{NH}_2\text{-OH}$ oder $\text{CH}_3\text{-OH}$ (-H an C oder N ggf. ersetzt durch andere Reste, beispielsweise Alkyl) durch Glutaminase, Arginase, Asparaginase oder Serinhydroxymethyltrans-

25 ferase. Dies führt zu einer erhöhten Spezifität, da ein Charakteristikum von Tumorzellen eine hohe Glutaminase und Serinhydroxymethyltransferase Aktivität ist. $\text{NH}_2\text{-OH}$ (Hydroxylamin, HA) beispielsweise kann von den hohen Pyruvatkinase Aktivitäten anstelle des -OH

30 des Phosphates (z.B. des ADP) phosphoryliert werden. Dies führt zur Entkoppelung der Pyruvatkinase-Reaktion in Tumorzellen. Daher umfasst die Erfindung in aller Allgemeinheit auch alle natürlichen Metaboliten der

erfindungsgemäßen Substanzen, insbesondere des Aminooxyacetat, i.e. Bruchstücke dieser Substanzen.

Im Transaminase-Komplex sind neben der PGM und NDPK
 5 die cytosolischen Isoformen der Glutamat Oxalacetat
 Transaminase (GOT), Glutamat Pyruvat Transaminase
 (GPT), Glutamat Dehydrogenase (GIDH) und Malat Dehydrogenase (MDH) assoziiert. Die GOT und MDH sind
 Bestandteile des Malat-Aspartat-Shuttle, über den der
 10 im Cytosol produzierte Wasserstoff in die Mitochondrien transportiert wird. Dabei wird NAD⁺ für die cytosolische Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase Reaktion recycled. Der Malat-Aspartat-Shuttle ist
 Bestandteil der Glutaminolyse. Für einen aktiven
 15 Malat-Aspartat-Shuttle ist neben der GOT das
 Vorhandensein der p36 gebundenen Form der MDH wichtig,
 wie in Beispiel 3 dargestellt.

Im Rahmen der Erfindung sind diverse weitere Ausführungsformen möglich. So kann eine erfindungsgemäße
 20 pharmazeutische Zusammensetzung mehrere verschiedene, unter die vorstehenden Definitionen fallende Verbindungen enthalten. Weiterhin kann eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung zusätzlich
 25 einen von der Verbindung der Formel I verschiedenen Wirkstoff enthalten. Dann handelt es sich um ein Kombinationspräparat. Dabei können die verschiedenen eingesetzten Wirkstoffe in einer einzigen Darreichungsform präpariert sein, i.e. die Wirkstoffe
 30 sind in der Darreichungsform gemischt. Es ist aber auch möglich, die verschiedenen Wirkstoffe in räumlich getrennten Darreichungsformen gleicher oder verschiedener Art herzurichten.

Als Gegenionen für ionische Verbindungen nach Formel I kommen Na⁺, K⁺, Li⁺, Cyclohexylammonium, oder basische Aminosäuren (z.B. Lysin, Arginin, Ornithin, Glutamin) in 5 Frage.

Die mit erfindungsgemäßen Verbindungen hergestellten Arzneimittel können oral, intramuskulär, periartikulär, intraartikulär, intravenös, intraperitoneal, subkutan oder 10 rektal verabreicht werden.

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln, die dadurch gekennzeichnet sind, dass man mindestens eine Verbindung der Formel I mit einem 15 pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und gegebenenfalls weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen in eine geeignete Darreichungsform bringt.

20 Geeignete feste oder flüssige galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Dragees, Tabletten, (Mikro) Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen sowie Präparate mit protrahierter 25 Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung übliche Hilfsmittel wie Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-, Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel und Lösungsvermittler, Verwendung finden.

30 Als Hilfsstoffe seien Magnesiumcarbonat, Titandioxid, Laktose, Mannit und andere Zucker, Talkum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Cellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle wie Lebertran, Sonnenblumen-, Erdnuß-

oder Sesamöl, Polyethylenglykole und Lösungsmittel, wie etwa steriles Wasser und ein- oder mehrwertige Alkohole, z.B. Glycerin, genannt.

5 Vorzugsweise werden die Arzneimittel in Dosierungseinheiten hergestellt und verabreicht, wobei jede Einheit als aktiven Bestandteil eine definierte Dosis der erfindungsgemäßen Verbindung gemäß Formel I enthält. Bei festen Dosierungseinheiten wie Tabletten, Kapseln, Dragees
10 oder Suppositorien kann diese Dosis 1 bis 1000 mg, bevorzugt 50 bis 300 mg, und bei Injektionslösungen in Ampullenform 0,3 bis 300 mg, vorzugsweise 10 bis 100 mg, betragen.

15 Für die Behandlung eines erwachsenen, 50 bis 100 kg schweren, beispielsweise 70 kg schweren, Patienten sind beispielsweise Tagesdosen von 20 bis 1000 mg Wirkstoff, vorzugsweise 100 bis 500 mg, indiziert. Unter Umständen können jedoch auch höhere oder niedrigere Tagesdosen
20 angebracht sein. Die Verabreichung der Tagesdosis kann sowohl durch Einmalgabe in Form einer einzelnen Dosierungseinheit oder aber mehrerer kleinerer Dosierungseinheiten als auch durch Mehrfachgabe unterteilter Dosen in bestimmten Intervallen erfolgen.

25

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von lediglich Ausführungsformen darstellenden Beispielen näher erläutert.

30

Beispiel 1: Quantifizierung der Wirksamkeit einer erfindungsgemäßen Verbindung

Einsetzbare Novikoff-Hepatom-Zellen sind von der Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg, (Cancer Research 1951 , 17, 1010) erhältlich. Es werden je 100.000 Zellen pro 25cm²-Kultivierungsflasche ausgesät. Eine

5 erfindungsgemäße Substanz wird, gelöst in einem für den Einsatz in Zellkulturen geeigneten Lösungsmittel wie z.B. Wasser, verd. Ethanol, Dimethylsulfoxid o.ä., in steigender Konzentration dem Kulturmedium zugesetzt, z.B. im Konzentrationsbereich von 80µM - 5000µM oder von 100µM

10 - 300 µM). Nach vier Kultivierungstagen wird die Zellzahl pro Flasche ausgezählt. Im Vergleich zu der Kontrollprobe (ohne Zugabe einer erfindungsgemäßen Verbindung oder mit ersatzweiser Zugabe einer Referenzverbindung) erkennt man das Maß und die Dosisabhängigkeit einer

15 Proliferationshemmung der eingesetzten Verbindung.

Beispiel 2: Auswanderung der PGM

20 In der Figur 1a ist eine isoelektrische Fokussierung eines Tumorzellextraktes (MCF-7 Zellen) gezeigt. Man erkennt, daß PGM den Glykolyse-Enzym-Komplex verläßt und in einen mit den cytosolischen Transaminasen assoziierten Komplex, dem Transaminase-Komplex, wandert. Der Transaminase-

25 Komplex ist wie folgt zusammengesetzt: cytosolische Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), c-Malat-Dehydrogenase (MDH), Phosphoglyceromutase (PGM). Nicht gezeigt sind: c-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), c-Glutamat-Hydroxypyruvat-Transaminase, c-Alanin-Hydroxypyruvat-

30 Transaminase, c-Serin-Hydroxymethyl-Transferase und c-Glutamat-Dehydrogenase (GIDH). Die PGM und die Nukleotid-Diphosphatkinase (NDPK) können sowohl im

Transaminase- als auch im Glycolyse-Enzym-Komplex
assoziiert sein.

5 Beispiel 3: Hemmung des Malat-Aspartat-Shuttle

In Figur 1b ist dargestellt der Effekt von Aminoxyacetat
(AOA) und Hydroxylamin (HA) auf die Aktivität des
cytosolischen und mitochondrialen Isoenzym der GOT in
10 vitro. Die Isoenzyme der GOT wurden durch eine
isoelektrische Fokussierung aufgetrennt. Man erkennt, dass
Aminoxyacetat vor allem das cytosolische Isoenzym und
Hydroxylamin beide Isoenzyme der GOT hemmt. Die Hemmung
der GOT führt zu einer Hemmung des Malat-Aspartat-Shuttle.
15 In der Folge kann NAD nicht recycelt werden und die
Glycolyse wird auf der Stufe der GAPDH gehemmt.

Die folgenden Ausführungen stehen unabhängig von den
20 vorstehenden Beispielen. Die Erfindung lehrt desweiteren
die Verwendung von N-(4'-trifluoromethylphenyl)-5-
methylisoxazole-4-carboxamid ($C_{12}H_7F_3N_2O_2$; MW 270,2, siehe
auch Figur 2a) und/oder seines natürlichen aktiven
Metaboliten A 77 1726 gemäß Figur 2b zur Herstellung einer
25 pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von
Tumorerkrankungen, insbesondere von soliden Tumoren. Dabei
kann der Benzolring alternativ zur dargestellten
Substitution mit -CF₃ generell mit -CHal₃ oder -O-CHal₃
oder -Hal an beliebiger Stelle, einfach, zweifach,
30 dreifach, vierfach oder fünfach substituiert sein. Die
erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist
besonders zur Behandlung großer Tumore geeignet, i.e. ab
0,1 bis 1 cm³ Tumorgroße. Eine erfindungsgemäße

- pharmazeutische Zusammensetzung ist beispielsweise zur oralen Gabe hergerichtet, beispielsweise mit folgenden Hilfs- und Trägerstoffen: kolloidales SiO_2 , Crospovidon, Hydroxypropylmethylcellulose, Laktosemonohydrat,
- 5 Magnesiumstearat, Polyethylenglykol, Povidon, Stärke, Talkum, TiO_2 , und/oder gelbes Eisenoxid. Die Dosierung beträgt täglich 1 bis 50 mg, vorzugsweise 10 bis 30 mg. Es kann sich empfehlen, anfangs einer Therapie eine
- 10 Startdosis von 20 bis 500 mg, insbesondere 50 bis 150 mg, für die ersten 1 bis 10 Tage, insbesondere ersten 1 bis 3 Tage, zu verabreichen. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die eingangs genannte Substanz mit einem oder mehreren Zuckerphosphaten, beispielsweise
- 15 Fructose-1,6-bisphosphat, Glycerat-2,3-bisphosphat, Glycerat-3-Phosphat, Ribose-1,5-bisphosphat, Ribulose-1,5-bisphosphat, kombiniert, wobei die Stoffkombination in einer Darreichungsform, beispielsweise
- 20 Tablette, gemischt sein kann. Es ist aber auch möglich, die Komponenten separat in gleichen oder verschiedenen Darreichungsformen zur Verfügung zu stellen. Das Zuckerphosphat kann in einer Dosierung von 20 bis 5000 mg pro Tag, beispielsweise 100 bis 500 mg, verabreicht werden.
- 25 Diese Varianten der Erfindung führt überraschenderweise zur Hemmung des Wachstums von Tumorzellen und Tumorgewebe, weil diese Substanzen bzw. der Metabolit an die Pyruvatkinase binden und den für Tumorzellen entgleisten Energiestoffwechsel hemmen oder rückgängig machen können. Aus
- 30 diesen zusammenhängen ergibt sich als besonderer Vorteil, daß diese Substanzen spezifisch in den Stoffwechsel von Tumorzellen und nicht oder weniger in jenen von

Normalzellen eingreifen und somit allenfalls geringe Nebenwirkungen auftreten.

Die Wirksamkeit dieser Substanzen ist deshalb über-
 5 raschend, weil die bekannte Wirkung als Pyrimidinsynthese-
 hemmer einen völlig anderen Wirkmechanismus betrifft und
 die phänomenologische Beobachtung einer antiproliferativen
 Wirkung im Wesentlichen auf Immunzellen und Zellen, die im
 Zusammenhang mit inflammatorischen Erkrankungen stehen,
 10 gerichtet ist.

Von besonderer Bedeutung ist auch eine Kombination eines
 oder mehrerer der auf der vorangehenden Seite genannten
 Wirkstoffe mit einem oder mehreren der weiter vorange-
 15 henden Wirkstoffe oder Aminooxyacetat (AOA,
 $\text{NH}_2\text{-O-CH}_2\text{-COOH}$, Salze oder Ester, beispielsweise C1 -C10
 Alkyl- oder Hydroxyalkylester, hiervon). Z.B. AOA ist ins-
 besondere auf kleine Tumore ($< 0,1$ bis 1 cm^3) wirksam bzw.
 verhindert deren Bildung, insbesondere die Metastasen-
 20 bildung, während Verbindungen der Formeln 10 oder 11, ggf.
 in Kombination mit Zuckerphosphat gegen die großen Tumore
 wirksam ist. Grund hierfür sind die unterschiedlichen
 Stoffwechsel in kleinen bzw. großen Tumoren. Die vorste-
 henden Ausführungen zu Kombinationen gelten analog.

25

Erfindungsgemäße Substanzen sind des weiteren verwendbar
 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur
 Behandlung der Herzinsuffizienz bzw. der Chronic Cardiac
 Failure (CCF). Hierunter fallen die im Rahmen der New York
 30 Heart Association (NYHA) Classification definierten Vari-
 anten bzw. Grade von NYHA I bis NYHA IV. Bei allen diesen
 Erkrankungen handelt es sich um ein akutes und/oder chro-
 nisches Unvermögen des Herzmuskels, bei Belastung oder

schon in Ruhe den für den Stoffwechsel des Organismus erforderlichen Blutauswurf bzw. die erforderliche Förderleistung aufzubringen. Ursachen hierfür liegen in der unzureichenden Glykolyse durch Glucosemangel im Herzmuskel
 5 und/oder dessen unzureichende Sauerstoffversorgung sowie in komplexen koronaren Entzündungsprozessen (Aktivierung von Zellen des Immunsystems sowie Komplement). Dieser Aspekt der Erfindung beruht dabei auf der Erkenntnis, daß mit den erfindungsgemäßen Substanzen alternative energierzeugende biochemische Prozesse moduliert werden und somit es auch möglich ist, gleichsam Ersatzpfade für die vorstehend genannten mangelhaft funktionierenden Prozesse zu schaffen, beispielsweise durch Aktivierung der Serinolyse oder Glutaminolyse oder mit erfindungsgemäßen Substanzen das existierende dynamische Gleichgewicht zwischen
 10 Glykolyse auf der einen Seite und der Glutaminolyse auf der anderen Seite zu Gunsten der Glykolyse zu verschieben unter gleichzeitiger Gabe von Sauerstoff (Erhöhung des Sauerstoff-Partialdruckes im Blut, beispielsweise durch Beatmung). In diesem Zusammenhang kann die Gabe von erfindungsgemäßen entzündungshemmenden Substanzen die drohende lebensgefährliche Acidose (durch Lactatbildung) vermieden werden. Gegenüber den bekannten Maßnahmen, wie Gabe von ACE-Hemmern, Diuretika, Digitalis, positiv inotropen Substanzen, oder Isosorbiddinitrat, wird mit erfindungsgemäßen Substanzen direkt in den
 15 Energiestoffwechsel eingegriffen und dieser verbessert. Nebenwirkungen sind folglich vergleichsweise gering.

30 In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen der Erfindung auch gefunden, daß zumindest in den Fällen der NYHA Grade II bis IV die Konzentration von Tumor M2-PK (= M2-PK dimer in Gegensatz zu Normal-M2-PK, welche tetramer vorliegt) in

Zellen und/oder dem Blut zunimmt, welche routinemäßig leicht, im Gegensatz zu bisher gängigen Methoden, bestimmt werden kann. Daher lehrt die Erfindung weiterhin die Verwendung eines Tumor M2-PK detektierenden Testsystems zur

5 Herstellung eines Diagnostikums zur in vitro Diagnose einer Herzinsuffizienz, insbesondere auch des Grades bzw. der damit verbundenen Entzündungsprozesse. Werden bei einem Patienten im Blutplasma gegenüber Standardwerten (definierte maximale Grenzwerte; Normalkollektiv) erhöhte

10 Tumor M2-PK Werte (Kollektiv der Erkrankten) gefunden, so ist dies indikativ für das Vorliegen einer Herzinsuffizienz und/oder für damit korrelierte Entzündungsprozesse, zumindest aber für das Risiko, an Herzinsuffizienz zu erkranken. Eine solche Blutplasmaanalyse ist einfach

15 und kurzfristig durchführbar. Demgegenüber sind bisherige Standardmethoden (Goldstandard, Blutgasanalyse) routineuntauglich und teuer. Es können im Rahmen dieses Aspektes der Erfindung beliebige bekannte Testsysteme eingesetzt werden, welche Tumor M2-PK detektieren, z.B. immunolo-

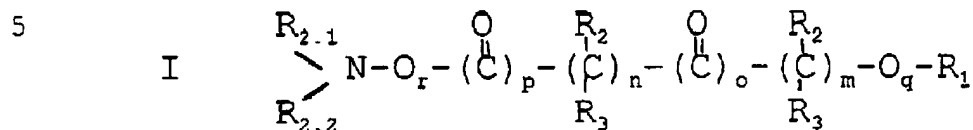
20 gische Testsysteme mit Antikörpern. Insbesondere sind auch per se bekannte Testsysteme einsetzbar, welche Tumor M2-PK als Tumorstoffwechselmarker detektieren, beispielsweise hierfür spezifische monoklonale Antikörper.

25 Diverse erfindungsgemäß einsetzbare Substanzen sind in den weiteren Figuren dargestellt. Dabei sind insbesondere die wesentlichen Variationsmöglichkeiten beispielhaft dargestellt, wobei die ohne weiteres daraus ersichtlichen Permutationen der Einfachheit halber nicht dargestellt

30 sind. Die Erfindung umfasst schließlich auch alle natürlichen Metaboliten der beschriebenen Substanzen

Patentansprüche:

1. Verbindung gemäß Formel I



- 10 wobei R1 = -H, -CN, -COO+, -COS+, -COOH, -COSH,
-COOR1.1, -COSR1.1, N-Phthalimidyl
wobei R1.1 = -H, C1-10 Alkyl, C1-10 Aralkyl bzw. Aryl,
wobei R2 = -H, C1-C4 Alkyl, -OR1.1, -Hal (-F -Cl, -Br,
-J), -NR2.1R2.2, -Am, -O-Am, -S-Am,
15 wobei R3 = -H, C1-C4 Alkyl, -OR1.1, -Hal (-F -Cl, -Br,
-J), -NR2.1R2.2, -Am, -O-Am, -S-Am,
wobei R2.1 = -H, C1-10 Alkyl, C1-10 Aralkyl bzw. Aryl,
wobei R2.2 = -H, C1-10 Alkyl, C1-10 Aralkyl bzw. Aryl,
wobei R2.1 und R2.2 gleich oder verschieden sein können,
20 wobei n und m gleich oder verschieden und 0 bis 10 sein
können,
wobei o und p gleich oder verschieden und 0 bis 3 sein
können,
wobei o > 0 ist, wenn n und m = 0 sind,
25 wobei R2 und R3 für Cn und/oder Cm gleich oder ver-
schieden sein können,
wobei R2 für jedes Cx=1...n gleich oder verschieden sein
kann,
wobei R3 für jedes Cy=1...m gleich oder verschieden sein
30 kann,
wobei -Am einen Aminosäurenrest darstellt,
wobei q und r = 0 oder 1 sowie gleich oder verschieden
sind,

wobei $-O_2-$ und/oder $-O_4-$ auch durch $-S_2-$ bzw. $-S_4-$ ersetzt sein kann,

wobei $-NR2.1R2.2$ ersetzt sein kann durch lineares oder verzweigtes $-C1-C20$ Alkyl, Aralkyl oder Aryl,

5 wobei eine Gruppe $-CN$, $-(CO)-CN$, $-(CO)-O-R1$ oder $-(CO)-R1$ oder $-C-O-R1$ ersetzt sein kann durch $-SO_2-NR2.1R2.2$,

oder ein physiologisch verträgliches Salz einer solchen Verbindung.

10

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei $R1 = -CN$ ist.

15 3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei $R2$ zumindest einfach als $-Am$ vorliegt, wobei $-Am$ vorzugsweise einen Aminosäurenrest einer essentiellen Aminosäure darstellt, wobei insbesondere $q = 0$ und $r = 1$ oder $q = 1$ und $r = 0$ oder $q = 1$ und $r = 1$, $m = 1$, $R3 = -H$, $n = o = p = 0$,
20 $R2.1 = R2.2 = -H$ ist.

4. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei $n = o = p = 0$ ist, wobei $m = 0$ bis 4 ist, wobei $R2 = R3 = -H$ ist,
25 wobei $R2.1 = R2.2 = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist.

5. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei $m = p = 0$ ist, wobei $o = 1$ ist, wobei $n = 0$ bis 4 ist, wobei $R2 = H$
30 ist, wobei $R3 = -H$ oder $-Hal$ im Falle von $Cx=1$ ist, wobei $R3 = -H$ ist für alle $Cx=n>1$, wobei $R2.1 = R2.2 = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist.

6. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei $m = 1$ bis 4 ist, wobei $n = o = p = 0$ ist, wobei $R2 = H$ ist, wobei $R3 = -H$ oder $-Hal$ im Falle von $Cy=1$ ist, wobei $R3 = -H$ ist für alle $Cy=m>1$, wobei $R2.1 = R2.2 = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist.
7. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei $o = p = 1$ ist, wobei $m = 0$ ist, wobei $n = 0$ bis 4 ist, wobei $R2 = R3 = -H$ ist, wobei $R2.1 = R2.2 = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist.
8. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei $n = p = 0$ ist, wobei $o = 1$ ist, wobei $m = 0$ bis 4 ist, wobei $R2 = R3 = -H$ ist, wobei $R2.1 = R2.2 = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist.
9. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei $m = p = 0$ ist, wobei $o = 1$ ist, wobei $n = 1$ bis 4 ist, wobei $R2 = R3 = -H$ ist, wobei $R2.1 = R2.2 = -H$ ist, wobei $q = 0$ und $r = 1$ ist.
10. Verbindung nach einem der Ansprüche 4 bis 9, wobei ein $R2$ durch $-Am$ ersetzt ist.
11. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung einer oder mehrerer

- Erkrankungen aus der Gruppe bestehend aus "Krebs, Rheuma, chronische Entzündungen, Asthma, Arthritis, Osteoarthritis, chronische Polyarthritis, rheumatische Arthritis, Inflammatory bowel disease, degenerative Gelenkserkrankungen, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises mit Knorpelabbau, Sepsis, Autoimmunerkrankungen, Typ I Diabetes, Hashimoto-Thyreoiditis, Autoimmunthrombozytopenie, Multiple Sklerose, Myasthenia gravis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Morbus Crohn, Uveitis, Psoriasis, Kollagenosen, Goodpasture-Syndrom, Erkrankungen mit gestörter Leukozyten-Adhäsion, Cachexie, Erkrankungen durch erhöhte TNFalpha Konzentration, Diabetes, Adipositas, bakterielle Infektionen, insbesondere mit resistenten Bakterien (antibiotisch)".
12. Pharmazeutische Zusammensetzung, wobei eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 mit einem oder mehreren physiologisch verträglichen Hilfstoffen und/oder Trägerstoffen gemischt und galenisch zur lokalen, insbesondere oralen, oder systemischen, insbesondere i.v., Gabe hergerichtet ist.
13. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur in vitro und/oder in vivo Hemmung der Glykolyse und/oder der Glutaminolyse, insbesondere von Pyruvatkinase, Asparaginase, Serindehydratasen, Transaminasen, Glutamat Oxalacetat Transaminase, Glutamat Pyruvat Transaminase, Glutamat Dehydrogenase, Malat Dehydrogenase, Desaminasen, und/oder Glutaminasen, insbesondere in Pro- und/oder Eukaryonten.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Verbindungen zur Modulation des Glykolyse Enzym-Komplexes und des Transaminase-

5 Komplexes, pharmazeutische Zusammensetzungen enthaltend solche Verbindungen sowie Verwendungen von solchen Verbindungen zur Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Behandlung verschiedener Krankheiten.

10

15

20

25

30